

variables: número de raíces principales (nRP), número de raíces secundarias (nRS), suma de las longitudes de todas las raíces (L), diámetro medio de cada raíz (D), superficie total (S) y volumen total (V) de cada raíz.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los valores de todas las variables fueron superiores en el montaje con papel Whatman, seguido de las cámaras con Termita y finalmente las cámaras con gel, excepto para el nRP que fueron más altos en estas últimas. Con el fin de determinar si las variables en cada uno de los genotipos, y en el conjunto de todos ellos, tienden a comportarse de forma similar en cada uno de los tres métodos, se han calculado las correlaciones entre los tres montajes tomando, para cada una de las variables de cada genotipo, el valor medio de las cuatro réplicas. En todos los casos se han obtenido correlaciones altas y significativas ($p < 0,05$), lo que indica que las variables se comportan de manera similar en los tres tipos de montaje. Considerando todos los genotipos y todos los experimentos realizados, se ha llevado a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para cada una de las variables, teniendo en cuenta los factores: réplica, especie, tipo de montaje y genotipo. Previamente y con el fin de normalizar las distribuciones, los datos se transformaron mediante la \sqrt{x} . No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre réplicas. Cuando se considera el factor especie, *B. distachyon* presenta diferencias con respecto a las otras dos especies para las variables: nRS, L, S, y D. En el caso de las variables nRP y V, las tres especies muestran entre sí diferencias significativas. Tomando como factor el tipo de montaje, hay diferencias significativas entre los tres en el caso de las variables: nRS y L. En las variables restantes, las diferencias se dan entre el montaje en cámara de gel y los otros dos. Finalmente, los ANOVA tomando como factor el genotipo indican que, los de *B. distachyon* y de *B. hybridum*, tienen similitud para la mayor parte de las variables. Sin embargo, los cuatro genotipos de *B. stacei* tienen una mayor variabilidad, presentando alguno de ellos diferencias para todas las variables, excepto para el diámetro medio de las raíces. En conclusión, el desarrollo de las raíces puede ser analizado con cualquiera de las tres metodologías propuestas, detectándose claras diferencias interespecíficas y en algunos casos también intraespecíficas para algunos caracteres de su sistema radicular.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto AGL2012-34052. (MINECO).

REFERENCIAS

- Aniol, A. 1981. Induction of aluminum tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminum in the nutrient solution. *Plant Physiol.* 75: 551-555.
- IBI 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 463: 763-768.
- Lobet, G., Page`s, L., Draye X. 2011. A novel image analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. *Plant Physiol.* 157: 29-39.
- Soler, C., Casanova, C., Rojo, A. 2004. Desarrollo de cubiertas vegetales a partir de gramíneas seleccionadas, para su explotación en tierras de olivar. *Actas de Horticultura*, 41: 97-100.
- Zhu, J., Ingram, P.A., Benfey, P. N., Elich T. 2011. From lab to field, new approaches to phenotyping root system architecture. *Curr. Opin. Plant Bio.*, 14: 310-317.

AMPLIACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA COLECCIÓN DE *AEGILOPS* CONSERVADA EN EL CRF-INIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES *NEGLECTA* Y *GENICULATA*

P. Giraldo¹, E. Benavente¹, R. Fite², M. Rodríguez-Quijano¹, E. Casadomet³, J. Sillero⁴, J. del Moral³, M. Ruiz²

¹ Departamento de Biotecnología, ETSIA, 28040 Madrid

² Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos, INIA, 28800 Alcalá de Henares

³ Dpto. Fitopatología. Centro La Orden-Valdesequera, 06071 Badajoz.

⁴ IFAPA, Centro Alameda del Obispo, 14080 Córdoba

Palabras clave: *geniculata*, *neglecta*, *triuncialis*, *ventricosa*, marcadores moleculares

INTRODUCCIÓN

La diversidad genética de las especies silvestres afines a las plantas cultivadas no está bien representada en las colecciones de bancos de germoplasma. Dentro del género *Aegilops*, las especies *Ae. geniculata* Roth., *Ae. neglecta* Req. Ex Bertol., *Ae. ventricosa* Tausch. y *Ae. triuncialis* L. son las más extendidas en la Península Ibérica (Slageren, 1994). Está demostrado que constituyen un extraordinario acervo genético de resistencias a factores bióticos y abióticos que son transmisibles al trigo (Gill et al., 1985). En 2010, en el CRF-INIA se conservaban solo 94 accesiones de estas especies, y algunas zonas de España no estaban representadas. Existe además un problema en la clasificación de material recolectado de las especies *geniculata* ($2n=4x$) y *neglecta* (que engloba formas $2n=4x$ y $2n=6x$), ya que presentan caracteres morfológicos muy parecidos y un amplio rango de variación intraespecífica (Zaharieva y Monneveux, 2006). La forma hexaploide de *neglecta* corresponde en realidad a la especie *Ae. recta* (sinónimo de *Ae. triaristata*- $6x$). El gran parecido entre los genomas constituyentes de estas especies, unido al considerable grado de polimorfismo que presentan, explican la dificultad de encontrar marcadores nucleares que ayuden a su correcta discriminación. Para reducir la complejidad, la búsqueda de polimorfismos se puede realizar en DNA extranuclear, ya que el citoplasma tiene distinto origen en estas especies.

Con el doble objetivo de incrementar la representación de la variabilidad genética de las especies *Ae. geniculata*, *Ae. neglecta*, *Ae. ventricosa* y *Ae. triuncialis* que han evolucionado en España, y diferenciar correctamente las especies *neglecta* y *geniculata* se ha desarrollado este proyecto (RF2011-00018) parte de cuyos resultados se exponen en este trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

La planificación de itinerarios y recolección de poblaciones se realizó analizando la distribución geográfica de las accesiones conservadas en el CRF-INIA y el Sistema de información sobre plantas de España del proyecto Anthos (<http://www.anthos.es>). Las expediciones se realizaron en la zona oeste, sur y centro de España.

Para el desarrollo de marcadores moleculares, es indispensable disponer de un conjunto de genotipos bien clasificados, por lo que se comprobó la correcta asignación taxonómica de un conjunto de accesiones de *Ae. neglecta* y *Ae. geniculata* obtenidas de distintos bancos de germoplasma mediante análisis cromosómico y técnicas de hibridación in situ con ADN ribosómico (Badaeva et al., 2004).

Para el análisis molecular, se seleccionaron los genes cloroplásticos trnT, trnL, trnF, trnK, matK y rpl32, por ser los que estaban más representados en las secuencias de *Ae. neglecta* y de

Ae. geniculata depositadas en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se diseñaron una serie de cebadores para amplificar regiones presumiblemente polimórficas entre ambas especies.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han recolectado 248 poblaciones de las cuatro especies en 13 provincias de la zona oeste, sur y centro. Además, se han repatriado 43 poblaciones que estaban conservadas en Bancos extranjeros. Esto supone que la colección ha triplicado su tamaño, y que zonas no representadas hasta ahora han sido incluidas. Algunas de estas poblaciones se han empezado a multiplicar y caracterizar, y ya están disponibles para su utilización.

El análisis citogenético reveló varios errores en la clasificación de las accesiones de los bancos de germoplasma. Una elevada proporción de las accesiones catalogadas como *Ae. neglecta*, correspondían en realidad a *Ae. geniculata* o a la especie hexaploide *Ae. recta* (*Ae. neglecta*-6x). Además, algunas accesiones clasificadas como *Ae. geniculata* pertenecen a la especie hexaploide *Ae. recta*. Estos resultados apoyan la necesidad de desarrollar marcadores moleculares que ayuden, de una forma sencilla, a la correcta clasificación taxonómica de estas especies. La caracterización citogenética ha permitido tener un conjunto de materiales inequívocamente clasificados en el que poder abordar el estudio molecular. En este conjunto se incluyen 5 genotipos de *Ae. recta* (*Ae. neglecta*-6x), 10 genotipos de *Ae. neglecta* (4x), y 8 genotipos de *Ae. geniculata* (4x).

El análisis de las secuencias amplificadas a partir de los genes cloroplásticos ha revelado la existencia de un gran número de polimorfismos, mayoritariamente intraespecíficos y de tipo SNP, pero también se han detectado algunos SNPs especie-específicos. Estos últimos se están corroborando, con el objetivo de desarrollar marcadores CAPs (*Cleaved amplified polymorphic sequence*) para aplicarlos al conjunto de poblaciones de *Ae. geniculata* y *Ae. neglecta* disponibles en el proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto RF2011-00018 del INIA y fondos FEDER.

REFERENCIAS

- Badaeva, E.D., Amosova, A.V., Samatadze, T.E., et al. 2004. Genome differentiation in *Aegilops*. 4. Evolution of the U-genome cluster. *Plant Systematics and Evolution* 246: 45-76.
- Gill, B.S., Sharma, C., Raupp, W.J., et al. 1985. Evaluation of *Aegilops* species for resistance to wheat powdery mildew, wheat leaf rust, Hessian fly, and greenbug. *Plant Disease* 69:314-316.
- Slageren van, M.V. 1994. Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae). Wageningen Agriculture University Papers, Wageningen-ICARDA, Aleppo, Syria.
- Zaharieva, M., Monneveux, P. 2006. Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its wild relatives in Europe. *Crop Sci.* 46:512-527.